



日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office

出願年月日

Date of Application:

1998年10月 2日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第296139号

[ST.10/C]:

[JP1998-296139.]

出願人

Applicant(s):

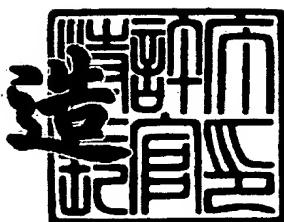
株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所



2002年 3月 29日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕



出証番号 出証特2002-3021959

【書類名】 特許願
 【整理番号】 SNMFP98379
 【提出日】 平成10年10月 2日
 【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿
 【国際特許分類】 C12N 5/10
 【発明の名称】 樹立細胞
 【請求項の数】 5
 【発明者】
 【住所又は居所】 宮城県仙台市太白区三神峰1丁目3番地3-501号
 【氏名】 細谷 健一
 【発明者】
 【住所又は居所】 宮城県仙台市泉区明石南2-1-5
 【氏名】 寺崎 哲也
 【発明者】
 【住所又は居所】 埼玉県川越市今福1672-1-719
 【氏名】 上田 正次
 【発明者】
 【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区八幡5-3-10-402
 【氏名】 帯刀 益夫
 【特許出願人】
 【識別番号】 395007255
 【氏名又は名称】 株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所
 【代理人】
 【識別番号】 100090941
 【氏名又は名称】 藤野 清也
 【電話番号】 3226-6671
 【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 014834
 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 樹立細胞

【特許請求の範囲】

【請求項1】 脈絡叢上皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが局在する樹立細胞。

【請求項2】 FERM BP-6508である、請求項1記載の樹立細胞。

【請求項3】 SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の脈絡叢上皮組織をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養して不死化細胞を得ることを特徴とする温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが局在する、不死化細胞の樹立方法。

【請求項4】 トランスジェニック動物としてラットを用いる請求項3記載の不死化細胞の樹立方法。

【請求項5】 SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の脈絡叢上皮組織をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養して得られる、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが局在する樹立細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、脈絡叢上皮細胞由来の樹立細胞に関する。本発明により得られる樹立細胞は、脳の栄養代謝研究、脳内への薬物透過研究や脳脊髄での物質代謝や透過の防御機構の研究に活用することできる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝及び恒常性機能障害に関連する疾患の診断あるいはその治療方法の開発の細胞レベルでの研究に有用である。

【0002】

【従来の技術】

従来、医薬品の安全性や有効性を精査する試験は、主に動物を用いて行なわれていた。しかし、動物愛護の観点から大量の動物を使用することを避け、培養細胞等を用いて試験管内で医薬品の有効性や安全性を試験する試験技術の実用レベルでの活用が試みられている。例えば、生体組織から採取した初代細胞や無限増殖する樹立培養細胞株を用いる方法で予め試験した後に動物試験を行なう試みがなされている。しかし、初代細胞は初期段階ではよく増殖するが、継代とともに次第に増殖が停止し、やがては死滅する（この現象を細胞老化と呼ぶ）。更に、初代細胞は生体組織から採取する度にその特性が異なることに加え、その細胞特性も継代とともに変化することが指摘されている。特に、増殖速度が非常に遅い場合や微小器官に由来する場合には試験に供するに足る初代細胞を得ることは非常に難しい。

【0003】

一方、初代細胞の継代を重ねるなかで、細胞老化を免れて無限増殖する能力を獲得した樹立細胞株では、安定して均一の特性を持つが、この様な細胞株の多くはその細胞が生体において本来有していた形態や機能の一部或いはその全てを喪失しているため、この様な細胞株を用いた場合には、その細胞株の由来する組織での本来の特性を正確に反映することは難しかった。

【0004】

そこで、初代細胞にrasやc-myc等の発癌遺伝子、アデノウイルスのE1A遺伝子、SV40ウイルスのラージT抗原遺伝子、ヒトパピローマウイルスのHPV16遺伝子等を導入して細胞を形質転換し、初代細胞の有する活発な増殖能を継続的に保持し、しかも継代することによってもその細胞固有の特性を喪失しない不死化細胞を樹立する試みがなされている。ところが、この様な不死化細胞においても対象とする臓器によっては、その初代細胞を調製し、これらの癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を導入する時点で、すでに幾つかの機能を喪失するため、本来の機能を保持する厳密な意味での不死化細胞の取得は困難であった。特に、増殖速度が非常に遅い場合や微小器官に由来する場合の初代細胞を調製して株化することは極めて困難であった。

【0005】

これに対し、近年確立された動物個体への遺伝子導入技術を用いて、個々の細胞に癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を導入するかわりに、これらの遺伝子を安定的に染色体に組み込んだ遺伝子導入動物を作出し、個体の発生時点において既に癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を細胞の中に保有する動物の臓器から初代細胞を調製して、これを継代することにより不死化細胞を樹立する方法が報告されている。特に、SV40の温度感受性突然変異株tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは、その臓器から不死化細胞を容易に得ることができ、得られた細胞の増殖や分化形質の発現を温度を変えることにより操作することができるため非常に有効である（Noble M. et al. (1995) *Transgenic Research* 4, 215-225 ; Obinata M. (1997) *Genes to Cells* 2, 235-244）。マウスに比べ体重が約10倍あるラットは、細胞樹立に供する細胞を各種臓器から取得するうえで、特に、脳内の微小器官に由来する細胞を株化する場合には、容易に組織を分離して多数の細胞を得ることができるため有利である。そこで、各種臓器から不死化細胞を容易に得ることができ、得られた細胞の増殖や分化形質の発現が温度を変えることにより操作することができる不死化細胞の樹立に有効なSV40の温度感受性突然変異株tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットを作出した。

【0006】

一方、神経作用性の薬物の血液脳脊髄関門防御機構に対する作用機作の研究において、動物愛護の観点から動物試験に替わる脈絡叢上皮細胞の初代細胞を用いる方法が試みられている。この場合には、試験に供するに足る細胞を恒常に小型実験動物から得ることが難しいため、これに替わる有効な細胞株が切望されていた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、このような状況に鑑み銳意研究の結果、不死化遺伝子を導入したトランスジェニックラットの脳の脈絡叢から上皮細胞株を分離し、不死化細胞を樹立するに至った。従って本発明は、脈絡叢上皮細胞由来であって温度感受性

SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが局在する樹立細胞を得ることを課題とする。

また、本発明は、SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を用いて、このような不死化細胞を樹立する方法を提供することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明は、脈絡叢上皮細胞由来の樹立細胞に関する。詳しくは、温度感受性 SV40 ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが局在する樹立細胞に関する。このような樹立細胞としては FERM BP-6508 を例示することができる。

また、本発明は、SV40温度感受性突然変異株 tsA58 のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の脈絡叢組織をプロテアーゼ処理し、得られる細胞の中から上皮細胞様に敷石状の形態を示す細胞を継代培養することによる不死化細胞の樹立方法に関する。このようなトランスジェニック動物としてはラットを例示することができる。

さらに本発明は、このようにして樹立された細胞に関する。

本発明により得られる樹立細胞は、多孔性平面膜上で単層培養すると細胞が相互に結合して閉鎖帶を形成し、表裏極性をもつ血液脳脊髄液関門を試験管内で再構築することができるため、脳の栄養代謝研究、脳内への薬物透過研究、脳脊髄での物質代謝あるいは透過の防御機構の研究に活用することできる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝、恒常性機能障害に関連する疾患の診断及びその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明で使用するSV40の温度感受性突然変異株 tsA58 のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットは、以下のように得ることができる。即ち、

まず、SV40の温度感受性突然変異株tsA58 のラージT抗原遺伝子を、例えば、SV40の複製起点(ori)を欠失させたtsA58 ri(-)-2 株の全ゲノムDNAを制限酵素BamHIで開環してpBR322に導入したプラスミドpSVtsA58ori(-)-2 (Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991))を常法に従い大腸菌内で大量に増幅させる。このようにして調製したプラスミドを制限酵素BamHIで切断してベクター部位を除去する。このようにして得られた tsA58のラージT抗原遺伝子を持つDNA(5,240bp)には、ラージT抗原遺伝子のプロモーターが内在するため、このDNAを導入したラットにおいては、その全ての体細胞においてこの遺伝子(tsA58のラージT抗原遺伝子)が発現することになる。次に、この様にして得られたDNAを常法に従いラットの全能性細胞に導入して温度感受性ラージT抗原遺伝子を全ての細胞内に有する遺伝子導入ラットを作出する。全能性細胞としては、受精卵や初期胚のほか多分化能を有するES細胞があげられる。この様な卵子や培養細胞へのDNA導入法はマイクロインジェクション法、電気パルス法、リポソーム法、リン酸カルシウム法等が利用できる。更に、所望する本遺伝子を導入した培養細胞の核を除核未受精卵に移植して初期化すること(核移植)で卵子に本遺伝子を導入することができる。しかし、遺伝子導入ラットを得る効率からは、現在のところ前核期受精卵の雄性前核に本遺伝子をマイクロインジェクションして得られる卵子を仮親の卵管に移植して産仔を得た後、注入遺伝子を持つ産仔を選出し、安定的に本遺伝子が組み込まれた個体を得ることで、個体発生時にすでにtsA58 のラージT抗原遺伝子が各組織の細胞の染色体に組み込まれた遺伝子導入ラットを効率よく作出することができる。

【0010】

次に、この様にして作出した遺伝子導入ラットの各臓器から常法に従い細胞(初代細胞)を取り出して継代培養を繰り返すことで不死化細胞を調製することができる。得られた細胞株は33~37°Cにおいて永久的増殖能を持ち、39°Cにおいては増殖を停止するため細胞固有の分化形質の発現を制御することができるという特色を持つ。このラットの脳を摘出して脈絡叢を採取する。細切した脈絡叢をトリプシン/EDTAで処理して細胞を遊離させ、血清を添加した培養液を加えて、酵素反応を停止させた後、細胞は遠心により回収し、培養液に分散させ、更に、遠

心して回収する操作を繰り返して洗浄する。得られた細胞を培養液に分散して培養プレートに播種し、33℃で培養し、3回の継代の後コロニー形成を行い、ペニシリングカップを用いて上皮細胞特有の敷石状の形態を示す増殖速度の比較的早いコロニーを周囲の細胞から単離する。この操作を2回行うことで、単細胞に由来する細胞株を単離する。得られた各細胞株について免疫染色を行い、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及びGLUT-1輸送担体の細胞膜上の局在性を、共焦点レーザー顕微鏡で検定して細胞を同定する。得られた細胞株はラージT抗原を発現し、50回の継代後も33℃において良好な増殖性を維持し、さらに $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseとGLUT-1輸送担体の発現を認め、特に単層培養したときに他の上皮細胞では側底膜側（漿膜側）に存在する $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが頂側膜(apical)側の細胞膜上に局在する細胞株である。

【0011】

【実施例】

以下の実施例をもって本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示したのみであり、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0012】

【実施例1】

トランスジェニックラットの作出

SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のDNAを導入したトランスジェニックラットは、下記の手順で作出了した。

①導入遺伝子の調製

マイクロインジェクションにはSV40の温度感受性突然変異株 tsA58のDNAを使用した。このDNAは tsA58のゲノムDNAを制限酵素 BamHIで開環し、pBR322のBamHI部位に導入し、Sfi I配列をSac IIに変換してSV40の複製起点(ori)を欠失するori(-)としたDNAクローンpSV tsA58ori(-)-2 (Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991) Fig.1 参照)から常法に従い調製した。即ち、大腸菌内で増幅させて得たプラスミドDNAのpSV tsA58 ori(-)-2を制限酵素 BamH I(宝酒造社製)で消化した後、アガロースゲル電気泳動(1% gel; ベーリンガー社製)を行ってベクター部分を分離した5240bpの tsA58のDNA(直鎖状DNA断片)をゲルから切り出した。アガラーゼ処理(0.6 unit/100mgゲル: Ag

arase ; ベーリンガー社製) によりゲルを溶解した後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿処理を行いDNAを回収した。回収した精製DNAをTEバッファー (1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl, pH 7.6)に溶解して 170 μg/mLの精製DNA溶液を得た。このDNA溶液を注入用バッファー (0.1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl, pH 7.6)で 5 μg/mLとなるように希釈して注入用DNA溶液を調製した。尚、調製したDNA溶液は注入操作まで -20°Cで保存した。

【0013】

②トランスジェニックラットの作出

ラット前核期受精卵への上記①で調製した注入用DNA溶液のマイクロインジェクションは下記の要領で行った。性成熟した8週齢のウイスター (Wistar) ラットを明暗サイクル12時間 (4:00~16:00 を明時間)、温度23±2°C、湿度55±5%で飼育し、膣スメアにより雌の性周期を観察して、ホルモン処理日を選択した。先ず、雌ラットに150IU/kgの妊馬血清性性腺刺激ホルモン [日本ゼンヤク: PMS 全薬 (pregnant mare serum gonadotropin; PMSG)] を腹腔内投与し、その48時間後に75IU/kg のヒト総毛性性腺刺激ホルモン [三共臓器: プベローゲン (human chorionic gonadotropin; hCG)] を投与して過剰排卵処理を行った後、雄との同居により交配を行った。hCG 投与32時間後に卵管灌流により前核期受精卵を採取した。卵管灌流及び卵の培養にはmKRB液 (Toyoda Y. and Chang M.C., J. Reprod. Fertil., 36, 9-22 (1974))を使用した。採取した受精卵を 0.1%ヒアルロニダーゼ (シグマ社製: Hyaluronidase Type I-S) を含むmKRB液中で37°C、5分間の酵素処理を行い卵丘細胞を除去した後、mKRB液で3回洗浄して酵素を除去し、DNA注入操作までCO₂-インキュベーター内 (5%CO₂-95%Air, 37°C, 鮫和湿度) に保存した。この様にして準備したラット受精卵の雄性前核にDNA溶液を注入した。注入操作した228個の卵を9匹の仮親に移植して出産させ80匹の産仔を得た。注入DNAのラットへの導入は、離乳直後に断尾して得た尾より調製したDNAをPCR法により検定 [使用プライマー; tsA58-1A, 5'-TCCTAATGTGCAGTCAGGTG-3' (1365 ~ 1384部位に相当), tsA58-1B, 5'-ATGACCGAGCTTGGCACTTG-3' (1571~1590部位に相当)] した。その結果、遺伝子の導入を認めた20匹 (雄6匹、雌8匹、性別不明6匹) の産仔を得た。これらの中から性成熟期間を経過

する12週齢まで生存した11ラインのトランスジェニックラット（雄ライン; #07-2, #07-5, #09-6, #12-3, #19-5, 雌ライン: #09-7, #11-6, #12-5, #12-7, #18-5, #19-8）を得た。これらのG₀世代のトランスジェニックラットとウイスター ラットを交配し、雄ファウンダーの2ライン（#07-2, #07-5）と雌ファウンダーの3ライン（#09-7, #11-6, #19-8）において次世代以降への遺伝子の伝達を確認した。

【0014】

【実施例2】

脈絡叢上皮細胞の分離

実施例1で得られた、SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラット（1匹）より、クリーンベンチ内で清潔に脳を摘出した。得られた脳の左右の側脳室の内側壁から第三脳室の上壁まで続く脈絡叢を採取し、PBSでよく洗浄した後、2 mLの氷冷したPBS中で組織を1～2 mm³に細切した。細切した組織を1 mLの10Xトリプシン/EDTA溶液（0.5% Trypsin/5.3mM EDTA; Gibco BRL社製）に懸濁して酵素処理（37℃, 20分間）を行った。ときどき軽く攪拌することで細切した組織を分散させた。得られた細胞を培養液（10% FCS, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μg/mL streptomycin sulfateを含むDMEM）で洗浄した。次に、2 mLの培養液に分散して1枚の35mmφ培養シャーレー（Falcon; Becton Dickinson社製）に播種し、33℃の炭酸ガス培養器（5% CO₂-95% Air, 飽和温度）内で培養（初代培養）した。培地を1週間に2回交換し、継代はトリプシン/EDTA液（0.05% Trypsin/0.53mM EDTA; Gibco BRL社製）を用いておよそ1週間隔で行った。3回の継代の後、10²～10³個の細胞を10cmφ培養シャーレーに播種して33℃の炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。培地を1週間に2回交換し、7～10日後に上皮細胞特有の敷石状の形態を示す細胞からなるコロニーを形成した増殖速度の比較的速いコロニーをペニシリノーカップを用いて周囲の細胞から単離し、得られた細胞を再び10cmφ培養シャーレーに播種して33℃の炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。ペニシリノーカップを用いて増殖速度の比較的速いコロニーを周囲の細胞から単離して5種の細胞株（TR-CSFB1, TR-CSFB2, TR-CSFB3, TR-CSFB4, TR-CSFB5）を得た。

この TR-CSFB3 株を工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センターに寄託した。受託番号は FERM BP-6508 である。

【0015】

【実施例3】

ラージT抗原タンパク質の確認

実施例2で得られた5種の細胞株のラージT抗原蛋白質を、ウエスタンプロット法（実験医学別冊バイオマニュアルUPシリーズ「分子生物学的アプローチによる癌研究プロトコール」 108~115 頁, 羊土社, 1995年発行）により検討した。5種の細胞株（継代数：10）を90mmφ培養シャーレーで飽和まで培養した。回収した細胞を1mLの3% SDS-PBS (pH7.4) で可溶化した後、遠心 (10,000rpm, 10分間) して不溶画分を除去した後、フラッドフォード法 (BIO-RAD社製 プロテインアッセイキットIIを使用) で総蛋白質量を定量した。それぞれ20μg の蛋白質をSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。3%スキムミルク溶液でブロッキングしたニトロセルロース膜に1次抗体として抗SV40ラージT抗原マウス抗体 (DP02-C, CALBIOCHEM社製) を、2次抗体としてHRP 標識抗マウスIgG 抗体 (Amersham社製) Aを反応させ、ラージT抗原蛋白質特異的な反応をアマシャム社製 ECLウエスタンプロティング検出システム (RPN2106M1) を用いて検出した。結果を表1に示す。この結果、得られた5種の細胞株全てにおいてラージT抗原蛋白質を確認した。

【0016】

【表1】

細胞株	TR-CSFB1	TR-CSFB2	TR-CSFB3	TR-CSFB4	TR-CSFB5
T抗原	+	+	+	+	+

【0017】

【実施例4】

Na⁺-K⁺ ATPaseとGLUT-1輸送担体の確認

得られた各細胞株を単層培養し、細胞膜に発現された $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及びGLUT-1輸送担体を免疫染色した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて確認した。実施例2で得られた細胞株TR-CSFBを35mm φディッシュ(Falcon)のコラーゲンコートカバーガラスの上に培養した。培養液を除去し、細胞をPBSで洗浄した後、4mLの固定液(3% paraformaldehyde, 2% sucroseを添加したPBS)を加え室温で15分間放置後、PBSでよく洗浄した。2mLのブロッキング液(Block Ace; 大日本製薬社製)を加え、37°Cで1時間放置してブロッキングした後、1次抗体(抗 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase β2ウサギ抗体; UBI社製、又は抗GLUT-1ウサギ抗体; Chemicon社製)を室温で1時間反応させた。PBSで4回洗浄後、2次抗体(FITCラベル抗ウサギIgG; Capel社製)を室温で1時間反応させ、PBSで4回洗浄した。最後に、ラベル化した細胞をグリセリン封入液(90% glycerolとなるようにPBSを加えた後、Perma Fluor(Lipshaw社製)を0.1(V/V)%添加したもの)で封入し、マニキュアにてカバーガラスの周囲を封入した。観察は、共焦点レーザースキヤン顕微鏡(CLSM; Swiss LSM 410, Swiss社製)で行なった。この結果、細胞株TR-CSFB3で $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase(図1)及びGLUT-1の発現を認め、特に、他の上皮細胞では側底膜側(漿膜側)に存在する $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが頂側膜(apical)側の細胞膜上に局在することから、得られた細胞株が脈絡叢上皮細胞株であると同定した。尚、他の細胞株においても同様の結果が得られた。

【0018】

【実施例5】

プロリン輸送機能の確認

得られた細胞のL-プロリンの輸送に対する濃度依存性を調べてL-プロリンの輸送能を求め、既報の脈絡叢におけるL-プロリンの輸送能と比較することで、得られた細胞株が脈絡叢上皮細胞としての機能を保持することを確認した。

実施例2で得られた細胞株TR-CSFB3を24穴細胞培養用プレートに 3×10^5 /ウェル/mLとなるように播き、33°Cの炭酸ガス培養器で24時間培養して細胞をコンフルエントにした。先ず、培地を吸引して除去した後、37°Cに温めたuptake buffer(122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1.4 mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.4 mM K₂HPO₄, 10 mM Hepes, 25 mM NaHCO₃)の溶液を5% CO₂-95% O₂で20分間バーリングし

て NaOH で pH7.4 に調整) で細胞を洗浄した。185KBq/mL の [³H]-L-pr line を含む 37°C に温めた 0.2 mL の uptake buffer を加えた。ただし、各プロリン濃度の uptake buffer は、非標識体の L-プロリンで 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 mM となるように調製した。30 分間の取り込み反応を行なわせ、細胞を PBS で 3 回洗浄した後、1 mL の 1 % トライトン X-100 を含む 1 mL の PBS を加え、室温で一晩静置して可溶化し、液体シンチレーションカウンター (Beckmann 社製 LS-6500) を用いて放射活性を測定した。又、タンパク質量を Bio-Rad 社製 DC プロテインアッセイキットを用いて測定した。L-プロリンの濃度に対する取り込み速度のプロット式 ($V = V_{max} \times [S] / (K_m + [S])$; V_{max} は最大速度定数、 K_m はミカエリス定数、 $[S]$ は基質濃度) を用いて L-プロリンの取り込みの K_m 及び V_{max} を非線形最少二乗法プログラム MULTI (Yamaoka K. et al. (1981) J. Pharmacobi-Dyn., 4, 879-885) を用いて解析した。結果を図 2 に示す。この結果、L-プロリン ([³H]-L-proline) の取り込みは濃度依存的であり、その K_m 値は 1.5 mM、 V_{max} 値は 2.4 nmol/min/mg protein であった。求めた K_m 値は、家兎脈絡叢での報告された値の 1.1 mM (Coben L.A. et al. (1972) Brain Res., 30, 67-82) と近似した。このことから、得られた細胞株が脈絡叢上皮細胞株の機能を保持することを確認した。

【0019】

【実施例 6】

コリン、ウアバインによるプロリン能動輸送の阻害

単離脈絡叢における L-プロリンの取り込みは Na^+ 依存性であることから、得られた細胞株における L-プロリンの取り込みの Na^+ 依存性を確認して、得られた細胞株が脈絡叢上皮細胞としての機能を保持することを、実施例 5 と同様の方法により確認した。ただし Na^+ -free 条件下でおこなうため uptake buffer の組成中の Na^+ をすべて coline に置換したものを用いた。又、ウアバインの効果を調べる (ウアバインは $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase の阻害剤であるため、 Na^+ の濃度勾配が消失する) 場合には、1 mM ウアバインを添加したトレーサーを含む uptake buffer を使用した。いずれも 30 分間の反応を行なった。結果を図 3 に示す。 Na^+ -free 条件下では L-プロリンの取り込みが 98% 阻害された。又、1 mM ウアバインにより

L-プロリンの取り込みが56%の阻害された。この結果から、細胞株TR-CSFB3におけるL-プロリンの取り込みは Na^+ 依存性であることが示された。このことから、得られた細胞株が脈絡叢上皮細胞株の機能を保持することを確認した。

【0020】

【発明の効果】

本発明により、脈絡叢上皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが局在する樹立細胞、及びSV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したト拉斯ジエニック動物の脈絡叢組織をプロテアーゼ処理することを特徴とする、不死化細胞の樹立方法が提供される。

本発明により得られる樹立細胞は、多孔性平面膜上で単層培養すると細胞が相互に結合して閉鎖帯を形成し、表裏極性をもつ血液脳脊髄液関門を試験管内で再構築することができるため、脳の栄養代謝研究、脳内への薬物透過研究、脳脊髄での物質代謝あるいは透過の防御機構の研究等に活用することができる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝あるいは恒常性機能障害に関連する疾患の診断及びその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

実施例4の樹立した細胞株(TR-CSFB3)の $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseの共焦点レーザースキヤン顕微鏡写真を示す。

上の写真は上面からみた顕微鏡写真で $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及びGLUT-1の発現がみられる。下の写真は、断面の顕微鏡写真で頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが局在している。

【図2】

実施例5の樹立した細胞株のプロリン能動輸送能を示す。

【図3】

実施例6の樹立した細胞株のプロリン能動輸送能のコリン、ウアバインによる

特平10-296139

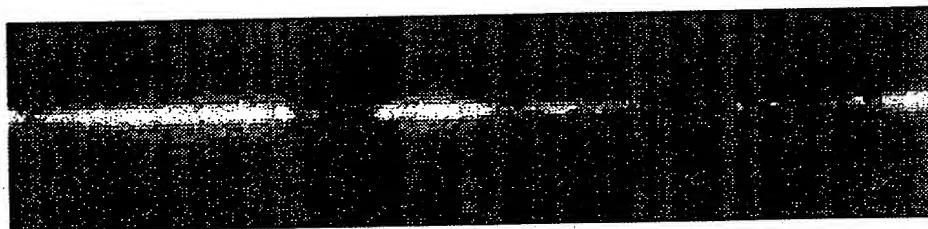
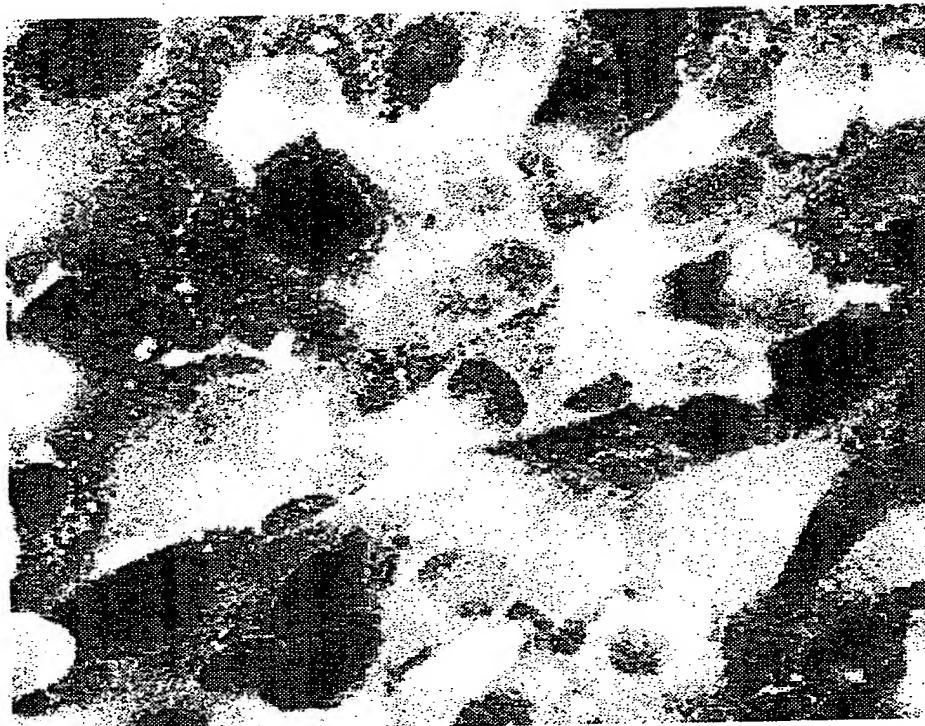
阻害を示す。

【書類名】

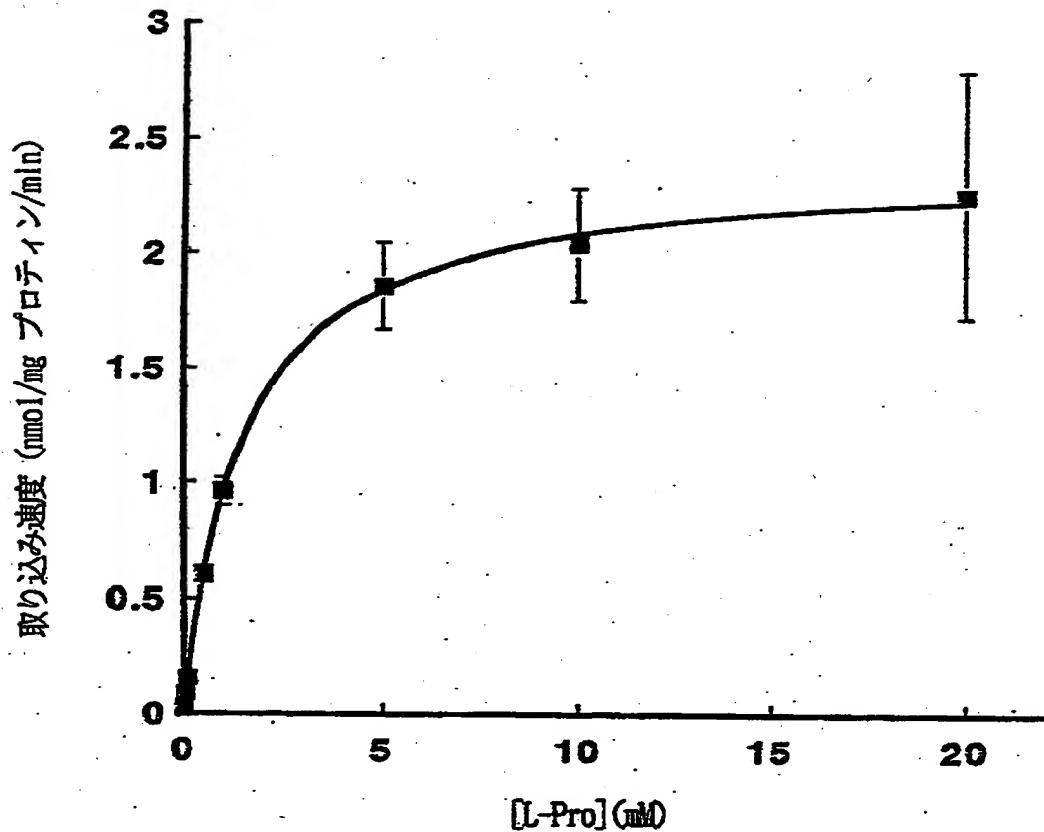
図面

【図1】

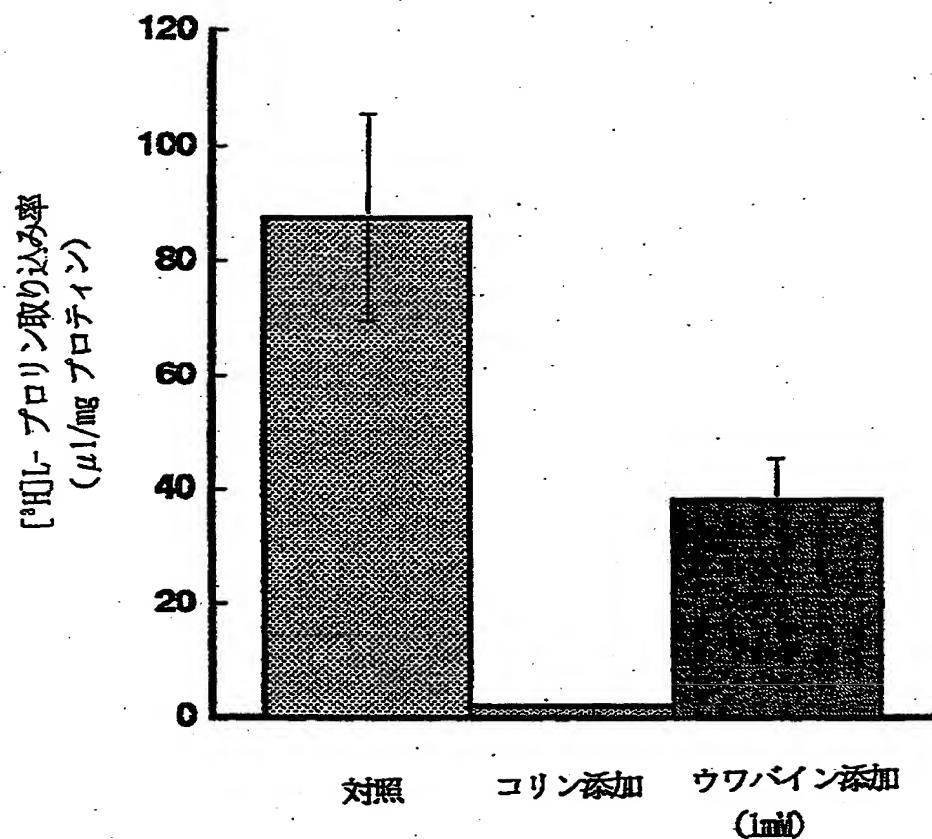
図面代用写真



【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 樹立細胞の提供。

【解決手段】 脈絡叢上皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseが局在する樹立細胞。

SV40温度感受性突然変異株tsA58 のラージT抗原遺伝子を導入したトラスジェニック動物の脈絡叢組織をプロテアーゼ処理し、得られた細胞を継代培養して不死化細胞を樹立する方法。

【効果】 医薬品の安全性及び有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝及び恒常性機能障害に関連する疾患の診断あるいはその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用。

【選択図】 なし



国際様式 INTERNATIONAL FORM

[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名（名称） 株式会社 ウイエスニュー・テクノロジー研究
所 取締役研究所長 上田 正次 殿
寄託者
あて名 〒 329-0512
栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林 5
19番地

1. 微生物の表示 (寄託者が付した識別のための表示) TR-CSFB3		(受託番号) FERM BP- 6508
2. 科学的性質及び分類学上の位置 1種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置		
3. 受領及び受託 本国際寄託当局は、平成10年 9月18日（原寄託日）に受領した1種の微生物を受託する。		
4. 移管請求の受領 本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に1種の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。		
5. 国際寄託当局 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Bioscience and Human-Technology 名 称： Agency of Natural Science and Technology 所 長 大曾 信一 Dr. Shin-ichi Ohmori Director-General あて名： 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地（郵便番号305-8566） 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN 平成10年(1998) 9月18日		

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 395007255
【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林519番地
【氏名又は名称】 株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所

【代理人】

【識別番号】 100090941
【住所又は居所】 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階
藤野特許事務所
【氏名又は名称】 藤野 清也

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 原寄託についての受託証 1

出願人履歴情報

識別番号 [395007255]

1. 変更年月日 1995年 3月31日

[変更理由] 新規登録

住 所 栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林519番地
氏 名 株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所